

ATIVIDADE DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO EM DOIS CLONES DE *Coffea canephora* SOB ESTRESSE OXIDATIVO MEDIADO POR PARAQUAT

Gustavo M. R. de OLIVEIRA¹ E-mail: gresque@vicoso.ufv.br, Breno L. S. GUIMARÃES¹, Vânia A. SILVA¹, Fábio M. DAMATTA¹, Marcelo E. LOUREIRO¹

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Resumo:

Os efeitos do estresse oxidativo, mediado por Paraquat (PQ), em diferentes concentrações (0, 5, 10, 20 e 30 μM), nas atividades da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), bem como danos celulares, foram investigados em dois clones de *Coffea canephora* Pierre (109A e 120, respectivamente sensível e tolerante à seca). No clone 109A, a atividade da SOD aumentou em paralelo a uma redução nas atividades da APX e CAT, até a concentração de 10 μM PQ, não mais se observando atividade dessas enzimas a maiores concentrações de PQ. No clone 120, observou-se aumento na atividade da SOD até 20 μM PQ, sendo acompanhado por atividades baixas, porém detectáveis, de APX e CAT naquela concentração de PQ; a exemplo do clone 109A, não se detectou atividade das enzimas avaliadas a 30 μM . A 0-10 μM PQ, as atividades da SOD e APX foram maiores no clone 120, enquanto a da CAT foi superior no clone 109A. A maior expressão do sistema antioxidante do clone 120 foi associada com a ocorrência de danos celulares (acúmulo de aldeído malônico) em menor extensão que no clone 109A. Os resultados sugerem, portanto, que diferenças na susceptibilidade de clones de *C. canephora* ao déficit hídrico podem estar associados, pelo menos em parte, a diferenças no desempenho do sistema antioxidante.

Palavras-chave: café, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, paraquat

ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN TWO CLONES OF *Coffea canephora* UNDER PARAQUAT-INDUCED OXIDATIVE STRESS

Abstract

The effects of oxidative stress mediated by Paraquat (PQ), applied at 0, 5, 10, 20 and 30 μM concentrations, on the activities of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), as well as cellular damages, were investigated in two clones of *Coffea canephora* Pierre (120 and 109A, respectively drought-tolerant and drought-sensitive). In clone 109A, SOD activity increased in parallel to reductions in activities of APX and CAT, up to 10 μM PQ; activities of these enzymes were not detected at higher PQ concentrations. In clone 120, SOD activity increased up to 20 μM PQ, which was accompanied by low, but detectable activities of APX and CAT; as found for clone 109A, enzyme activities were not detected at 30 μM PQ. At 0-10 μM PQ, activities of SOD and APX were larger in clone 120 than in clone 109A, the opposite being observed for CAT. The more robust antioxidant system of the clone 120 was associated with less cellular damages (as judged by lower levels of malonaldehyde) than in clone 109A. The results suggest that differential susceptibility to water deficit, as found in clones of *C. canephora*, might be associated, at least in part, with differences in performance of the antioxidant system.

Keywords: coffee, antioxidant enzymes, oxidative stress, paraquat

Introdução

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é potencializada por vários estresses, como exposição a níveis elevados de irradiância, seca, metais pesados, elevada concentração de sais, extremos de temperatura, radiação ultravioleta, poluição do ar, herbicidas, estresses físico e mecânico e, também, como resposta aos estresses bióticos, como os causados por ataque de patógenos (Asada, 1999). As ERO's que se formam como consequência da redução do oxigênio são, principalmente, o radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\cdot), os quais, em conjunto com o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que se forma no processo fotoquímico da fotossíntese, são as formas biológicas mais importantes de radicais livres. Essas formas ativadas de oxigênio são extremamente reativas e citotóxicas para todos os organismos, inativando enzimas e provocando importantes danos, em nível celular. São, também, responsáveis pelo início da peroxidação de lipídios e produzem radicais peroxilipídios e hidroxilipídios que, por sua vez, são também muito reativos. A peroxidação dos lipídios da plasmalema provoca perda de eletrólitos, rápida dessecação e morte celular (Benson, 1990).

Pelo fato de viverem em um ambiente altamente oxidativo, os organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para proteger suas células dos efeitos tóxicos dos ERO's. As defesas enzimáticas incluem,

principalmente, a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), redutase da glutationa (GR), peroxidase da glutationa (GPX), redutase do monodesidroascorbato (DH) e redutase do desidroascorbato (DR) (Navari-Izzo et al., 1997; Asada, 1999; Fourcroy, 1999; Loggini et al., 1999; Fu e Huang, 2001).

Várias evidências indicam que os mecanismos de tolerância de uma determinada espécie ao déficit hídrico podem estar associados, também, com a tolerância ao estresse oxidativo (Smirnoff et al., 1995), como o ocasionado por elevados níveis de Paraquat (PQ), assim como a um incremento na atividade de enzimas de defesa contra oxirradicais e de substâncias não-enzimáticas que atuam seqüestrando radicais livres (Baisak et al., 1992; Zhang e Kirkham, 1994). A eficiência dessa regulação pode ser diferencialmente atribuída a plantas tolerantes ou sensíveis ao estresse oxidativo. A participação e a função das enzimas antioxidantes na proteção contra o estresse oxidativo têm sido demonstradas com o uso de plantas transgênicas (Foyer et al., 1994). Plantas transgênicas superexpressando algumas enzimas antioxidantes mostraram um aumento na tolerância ao estresse oxidativo, induzido por luz e PQ (Gupta et al., 1993; Perl et al., 1993; Bowler et al., 1994).

Em *Coffea canephora* (café robusta), por exemplo, os mecanismos de defesa contra ERO's parecem ser mais efetivos no clone 120, tolerante à seca, em comparação com o clone 109A, sensível à seca (Lima et al., 2002; Pinheiro et al., 2004). Torna-se essencial que estudos relacionados com as bases fisiológicas da tolerância ao estresse oxidativo sejam feitos para obterem-se informações que visem a uma melhor caracterização dessa tolerância em café. Neste trabalho, o PQ foi, portanto, utilizado para explorar a hipótese de que clones de café robusta, considerados tolerantes à seca, devem ter maior eficiência de proteção contra ERO's que clones considerados sensíveis à seca, quando submetidos ao estresse oxidativo.

Material e Métodos

Dois genótipos de *C. canephora* Pierre. (clones 109A e 120, respectivamente, sensível e tolerante à seca) foram cultivados em casa de vegetação, com irrigação contínua e sob irradiância média, ao meio-dia, em torno de $900 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Folhas de plantas de dez meses de idade foram utilizadas para os experimentos de estresse oxidativo. Foram selecionadas folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice, de ramos plagiotrópicos. Extraíram-se, dessas folhas, discos foliares que foram infiltrados com soluções de PQ, nas seguintes concentrações: 0; 5; 10; 20; e 30 μM .

Foram determinadas as atividades de algumas enzimas-chave do sistema antioxidante, de acordo com o método espectrofotométrico, descrito por seus respectivos autores: a SOD (Giannopolitis e Ries 1977), a APX (Nakano e Asada 1981) e CAT (Havir e McHale 1989).

Danos celulares foram avaliados por meio da peroxidação de lipídeos, via acúmulo de aldeído malônico (MDA), como descrito por Cakmak e Horst (1991).

A extensão das injúrias causadas nos discos foliares tratados com Paraquat foi determinada com a utilização do software QUANT (Vale, 2003).

Resultados e Discussão

As atividades totais da SOD aumentaram apreciavelmente sob condições de estresse oxidativo, observando-se incrementos significativos a 10 e 20 μM PQ (82 e 61 %, comparados com as plantas-controle), respectivamente nos clones 109A e 120, concentrações de PQ nas quais as atividades da SOD foram máximas (Fig. 1A). Embora altos níveis de PQ tenham efeito deletério na atividade da SOD, observou-se uma maior sensibilidade no clone 109A, não se detectando atividade dessa enzima a 20 μM PQ, enquanto o mesmo fato, no clone 120, só pôde ser observado a 30 μM . Essa sensibilidade diferente a PQ, encontrada entre os clones de café estudados, poderia estar associada com capacidades distintas para eliminação do superóxido formado.

Impondo-se um estresse oxidativo severo, via elevadas concentrações de PQ, pôde-se observar uma redução na atividade total da SOD, em decorrência, provavelmente, de sua inativação e degradação, ocasionado pela grande concentração de ERO's (Casano et al., 1999). De qualquer modo, a redução da atividade da SOD, sob altas concentrações de PQ, deve estar associada com danos severos ao fotossistema I (Havaux e Davaud, 1994).

A atividade da APX, no clone 109A, foi severamente mais afetada pelo estresse oxidativo, diminuindo por volta de 92%, a 10 μM de PQ, não sendo mais detectada a maiores níveis de PQ, ao passo que, no clone 120, a 20 μM de PQ, ainda se obteve alguma atividade (20 % em relação ao controle), mas não a 30 μM . (Fig. 1B). A inativação da APX em folhas de *Triticum aestivum* submetidas ao tratamento com PQ esteve, aparentemente, associada com uma menor concentração de ascorbato e acumulação de H_2O_2 , pelo fato de o herbicida gerar espécies reativas, por retirar elétrons do FSI e simultaneamente inibir a fotoredução do monodesidroascorbato (Asada, 1999; Mano et al., 2001).

A inibição da APX acarreta elevados níveis de H_2O_2 e, com isso, ocasiona danos oxidativos (Miyagawa et al., 2000). Resultados similares, observados para a APX, foram encontrados para a CAT, porém em níveis menos expressivos, com um decréscimo de 60 % para o clone 120 e de 64 % para o clone 109A, a 10 μM de PQ. Ademais, o clone 109A, além de apresentar atividades da CAT mais elevadas até 10 μM de PQ, também apresentou maiores atividades dessa enzima nas plantas-controle em relação às do clone 120, o que poderia ser interpretado como uma evidência indireta de maiores níveis constitutivos da CAT. Entretanto, a perda total da CAT ocorreu a menores concentrações de PQ no clone 109A (20 μM) que no clone 120 (30 μM) (Fig. 1C).

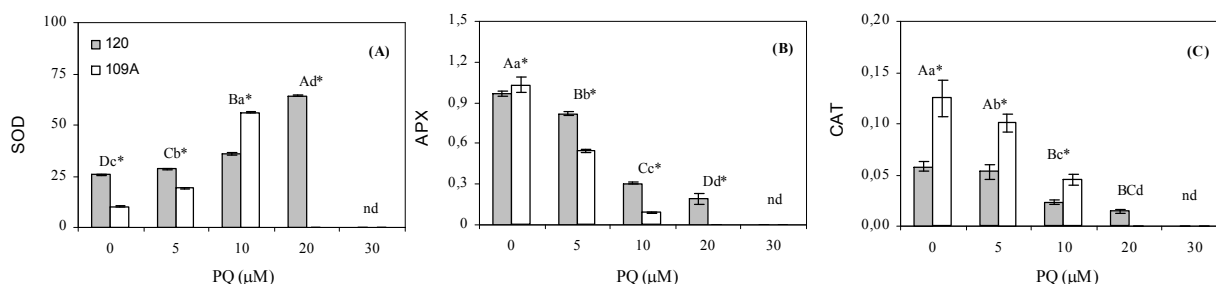


Fig. 1. Atividade específica da dismutase do superóxido (SOD, A), da peroxidase do ascorbato (APX, B) e da catalase (CAT, C), em discos foliares de dois clones de *Coffea canephora*, submetidos a diferentes concentrações de Paraquat (PQ). Atividades enzimáticas são expressas em unidade da enzima por miligrama de proteína. As unidades são definidas como: SOD, quantidade de enzima que inibe em 50 % a redução do azul de nitrotetrazólio; APX, $\mu\text{mol Asc min}^{-1}$; CAT, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$. Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão. Médias seguidas de mesma letra maiúscula (clone 120) ou minúscula (clone 109A) não diferem nas diferentes concentrações de PQ pelo teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Médias dos clones 120 e 109A seguidas de asteriscos (*), para uma mesma concentração de PQ, diferem entre si pelo teste “t” ($P < 0,05$). nd= não detectada

Nas plantas do clone 109A, submetidas ao estresse oxidativo, esperam-se, potencialmente, danos oxidativos em maior profundidade que no clone 120. De fato, independentemente da concentração de PQ, os níveis de MDA foram significativamente maiores naquele clone (Tabela 1). A produção de MDA aumentou gradativamente, com o aumento das concentrações de PQ utilizadas, nos dois clones avaliados. No entanto, a 30 μM de PQ, houve um decréscimo no acúmulo de MDA, em ambos. De modo inverso, a porcentagem de áreas com injúrias necróticas nos discos foliares do clone 109A foi quase 100% maior que nos discos do clone 120, em todos os tratamentos em que se empregou PQ (Tabela 2), provavelmente, um reflexo da maior tolerância do clone 120 ao estresse oxidativo, cujo tratamento de 30 μM acarretou numa extensão de área necrótica de 33%, contra 69% no clone 109A.

Tabela 1. Peroxidação de lipídeos, estimada pela produção de aldeído malônico (MDA) e extensão de injúrias necróticas, avaliadas pelo programa QUANT, em discos foliares de dois clones de *Coffea canephora* (120 e 109A), submetidos a diferentes concentrações de paraquat (PQ). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão. Nas colunas, para um mesmo clone, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si. Nas linhas, dentro de cada tratamento, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$, teste “t” e Newman-Keuls).

Tratamentos PQ (μM)	Clone 109A		Clone 120	
	MDA ($\text{nmol g}^{-1} \text{MS}$)	NECROSE FOLIAR (%)	MDA ($\text{nmol g}^{-1} \text{MS}$)	NECROSE FOLIAR (%)
0	396,8 \pm 6,8 d A	0	354,5 \pm 4,7 d B	0
5	495,5 \pm 4,3 c A	22 \pm 4 d A	418,7 \pm 3,1 c B	12 \pm 1 d B
10	530,1 \pm 3,3 b A	34 \pm 2 c A	465,3 \pm 6,4 b B	17 \pm 4 c B
20	718,6 \pm 4,6 a A	43 \pm 1 b A	490,2 \pm 4,0 a B	25 \pm 2 b B
30	304,3 \pm 7,8 e A	69 \pm 3 a A	276,7 \pm 3,7 e B	33 \pm 1 a B

Os resultados aqui apresentados estão em concordância com os de outros estudos (Iturbe-Ormaetxe, et al., 1998; Borsani et al., 2001), corroborando a hipótese de que o estresse oxidativo, induzido por PQ, pode, de fato, induzir a peroxidação de lipídios de membranas, mediante a produção de ERO’s. Como mencionado anteriormente, o clone 120 é mais tolerante à seca do que o clone 109A, e essa tolerância deve estar, de certa forma, relacionada com uma resposta no sistema antioxidante. Pode-se inferir, ainda, que maiores atividades da SOD e APX, no clone 120, parecem ter resultado numa menor proporção de ERO’s, conforme sugerido por seus menores níveis de peroxidação de lipídios e menor extensão de áreas necróticas, em relação ao clone 109A (Tabela 1).

Conclusões

A maior tolerância ao estresse oxidativo, observada no clone 120, que é mais tolerante ao déficit hídrico que o clone 109A, deve estar relacionada com sua maior capacidade em manter uma maior atividade da SOD e APX sob condições de estresse oxidativo. Essa característica correlacionou-se com menor peroxidação de lipídeos e menor extensão de necrose foliar observadas no clone mais tolerante à seca, sob diferentes concentrações de PQ. Estes dados sugerem que o aumento da atividade da SOD do clone 120 pode ter resultado em uma menor produção de ERO's. Em suma, diferenças na expressão do sistema antioxidativo, de modo a limitar danos celulares, podem explicar, em parte, porque alguns genótipos de *Coffea canephora*, como o clone 120, são mais resistentes ao déficit hídrico que outros, como o clone 109A.

Referências bibliográficas

- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 50, 601-639.
- Benson, E.E. 1990. Free radical damage in stored plant germoplasm. Roma, **IBPRG**, 128p.
- Borsani, O.; Díaz, P.; Agius, M.F.; Valpuesta, V.; Monza, J. 2001. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. **Plant Sci.** 161, 757-763.
- Bowler, C.; Van Camp, W.; Van Montagu, M.; Inze, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** 13, 199-218.
- Baisak, R.; Rana, D.; Acharya, P.; Kar, M. 1992. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiol.** 5, 489-495.
- Cakmak, I.; Horst, J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.** 83, 463-468.
- Casano, L.M.; Mercedes-Martín, M.; Zapata, J.M.; Sabater, B. 1999. Leaf age and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. **Plant Sci.** 149, 13-22.
- Fourcroy, P.D. 1999. Iron and oxidative stress in plants. In: Smallwood, M.F.; Calvert, C.M.; Bowles, D.J. (Eds.), Plant responses to environmental stress. Oxford: **BIOS Scientific Publishers** 51-57.
- Foyer, C.H.; Descourvieres, G; Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studies in transgenic plants. **Plant Cell Environ.** 17, 507-523.
- Fu, J.; Huang, B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. **Environ. Exp. Bot.** 45, 105-114.
- Giannopolitis, C.N.; Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiol.** 59, 309-314.
- Gupta, A.S.; Heinen, J.L.; Holaday, A.S.; Burke, J.J.; Allen, R.D. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, 1629-1633.
- Havaux, M.; Davaud, A. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem II activity. **Photosynth. Res.** 40, 75-92.
- Havir, E.A.; McHale, N.A. 1989. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana glauca* by high CO₂. **Plant Physiol.** 89, 952-957.
- Iturbe-Ormaetxe, I.; Escuredo, P.R.; Arrese-Igor, C.; Becana, M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiol.** 16, 173-181.
- Lima, A.L.S.; DaMatta, F.M.; Pinheiro, H.A.; Totola, M.R.; Loureiro, M.E. 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environ. Exp. Bot.** 47, 239-247.
- Loggini, B.; Scartazza, A.; Brugnoli, E.; Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiol.** 119, 1091-1099.
- Mano, J.; Ohno, C.; Domae, Y.; K. Asada, K. 2001. Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relative relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. **Biochem. Biophys. Acta Bioenerg.** 1504, 275-287.
- Miyagawa, Y.; Tamoi, M.; Shigeoka, S. 2000. Evaluation of the defence system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. **Plant Cell Physiol.** 41, 311-320.
- Nakano, Y.; Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.** 22, 867-880.
- Navari-Izzo, F.; Meneguzzo, S.; Loggini, B.; Vazzana, C.; Sgherri, C.L.M. 1997. The role of glutathione system during dehydration of *Boea hygroskopica*. **Physiol. Plant.** 99, 23-30.
- Perl, A.; Perl-Treves, R.; Galili, S.; Aviv, D.; Shalgi, E.; Malkin, S.; Galun, E. 1993. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutases. **Theor. Appl. Genet.** 85, 568-576.
- Pinheiro, H.A.; DaMatta, F.M.; Chaves, A.R.M.; Fontes, E.P.B.; Loureiro, M.E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Sci.** 167, 1307-1314.
- Smirnoff, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff, N. (Ed.), Environment and plant metabolism – flexibility and acclimation. Oxford: **BIOS Scientific Publishers** 217-243.

- Vale, F.X.R.; Fernandes Filho, E.I.F.; Liberato, J.R. 2003. *QUANT* – A software for plant disease severity assessment. **International Congress of Plant Pathology**, 8. Christchurch, ISPP. 105.
- Zhang, J.; Kirkham, M.B. 1994. Drought stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. **Plant Cell Physiol.** 35, 785-791.